



UNIVERSITE DE LIEGE - FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE

DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES

SERVICE D'OBSTETRIQUE ET PATHOLOGIES DE LA REPRODUCTION DES EQUIDES, DES RUMINANTS ET DES PORCS

Application de l'échographie à l'ovum pick up chez la jument.

Effet de la cystéamine sur la maturation des ovocytes équins mesuré par coloration au bis-benzamide et par transfert d'ovocytes.

Ultrasonography and ovum pick up in the mare.

Effect of cysteamine on equine oocytes maturation assessed by bis-benzamide staining and oocyte transfer.

Stefan Deleuze

**MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE
DE DEA EN SCIENCES VETERINAIRES**

ANNEE ACADEMIQUE 2002-2003

Résumé

Afin d'analyser l'effet de la cystéamine sur la maturation et la fécondation des ovocytes équins nous avons collecté des ovocytes par ponction folliculaire transvaginale échoguidée. Les ovocytes ont été cultivés *in vitro* pendant 30 heures, puis transférés dans l'oviducte de juments receveuses inséminées. Nous avons utilisé le stade nucléaire après maturation *in vitro* comme critère de maturation nucléaire et les taux de production d'embryons après transfert d'ovocytes comme critère de maturation cytoplasmique. Contrairement à ce qui a été observé dans d'autres espèces, aucun effet positif de la cystéamine sur la maturation *in vitro* n'a pu être démontré par notre protocole. D'autres travaux sur les effets de la cystéamine et sur les mécanismes de la maturation *in vitro* des ovocytes équins sont nécessaires.

Mots-clés : cystéamine, GIFT, OPU, ovocyte, cheval

Summary

The effect of cysteamine on *in vitro* maturation of equine oocytes collected by transvaginal ultrasound guided follicular aspiration was assessed. We used nuclear stage after DNA Hoechst staining, as a criterion for nuclear maturation and embryo yield following oocyte transfer for cytoplasmic maturation. Ovum pick up yields and maturation rates were similar to those previously reported. Although it has been described in other domestic species, no effect of cysteamine on *in vitro* maturation could be established by our experiment. Further work on effects of cysteamine and on the mechanisms of *in vitro* maturation of equine oocytes is needed.

Keywords: cysteamine, GIFT, OPU, oocyte, horse

Introduction

La production d'embryons *in vitro* est aujourd'hui une technique efficace pour donner des produits vivants, tant chez l'humain que chez de nombreuses espèces domestiques comme rapporté par Dell'Aquila et collaborateurs [Dell'Aquila, 1996 #400] telles que le cochon, les moutons et les bovins [Squires, 1996 #156]. Néanmoins, les techniques conventionnelles de maturation *in vitro* (MIV)/fécondation *in vitro* (FIV) n'ont donné que des résultats beaucoup plus décevants dans l'espèce équine [Dell'Aquila, 1996 #400][Hinrichs, 1998 #273]. A ce jour, seuls deux poulains vivants ont pu être produits par FIV [Palmer, 1991 #53]. Une meilleure compréhension des processus de maturation des ovocytes, de fécondation et de développement précoce des embryons est nécessaire pour améliorer les résultats de la FIV. Malheureusement, le manque de matériel ovocytaire disponible pour les études freine les avancées nécessaires [Alm, 1994 #342]. Les traitements de superovulation n'ont jusqu'à ce jour pas donné de résultats probants dans l'espèce équine [Dippert, 1994 #224][Bezard, 1995 #401]. Par ailleurs, les ovaires d'abattoir fournissent un matériel qui présente plusieurs inconvénients : manque de répétabilité, délai entre le moment de la ponction et la mise en maturation et manque d'information quant au stade du cycle oestral des juments dont proviennent les ovocytes. Depuis qu'elle a été décrite pour la première fois par Bruck et collaborateurs [Bruck, 1992 #399], la ponction ovocytaire échoguidée par voie transvaginale chez la jument est devenue une source alternative d'ovocytes tant matures qu'immaturs. Les ovocytes immatures collectés par ponction transvaginale peuvent être maturés *in vitro*. Comme l'ont rapporté Goudet et collaborateurs [Goudet, 2000 #404], la plupart des études indiquent que les taux de maturation ne s'améliorent pas au-delà de 30 heures de maturation. Au terme de la mise en culture, 40 à 70% des ovocytes équins sont en métaphase II [Bogh, 2002 #13][Goudet, 1997 #12][Squires, 1996 #156]. Par contre, comme rapporté par Goudet et collaborateurs [Goudet, 2000 #404], chez la vache, la chèvre et la truie, les taux sont supérieurs à 90%. Les problèmes de maturation *in vitro* des ovocytes équins pourraient être liés au stress oxydatif. En effet, l'ovocyte équin, particulièrement riche en vésicules lipidiques, est sensible à l'oxydation.

Le glutathion (GSH) est un thiol intracellulaire majeur qui sert de réservoir de cystéine [de Matos, 2000 #234] et dont plusieurs rôles ont été décrits, dont un rôle de protection contre le stress oxydatif. Il agit entre autre comme transporteur d'acides aminés, dans la synthèse des protéines et de l'ADN et dans la réduction des disulfides [de Matos, 1996 #237][Gruppen, 1995 #230]. Pendant le développement et la maturation de l'ovocyte au sein de l'ovaire, les taux de GSH augmentent au fur et à mesure que le follicule approche de l'ovulation [Perreault, 1988 #427]. Cette augmentation a été observée chez le bovin, le hamster, la souris, comme l'ont rapporté Yamauchi et collaborateurs [Yamauchi, 1999 #239], mais aussi chez le porc [Yoshida, 1993 #429]. Cette augmentation du taux de

GSH confère à l'embryon une protection contre le stress oxydatif cellulaire durant les dernières étapes de la fécondation [de Matos, 1996 #237]. D'autre part, le GSH facilite la formation du pronucleus mâle [de Matos, 2000 #234][de Matos, 1995 #238]. Takahashi et collaborateurs [Takahashi, 1993 #432] ont démontré que l'adjonction de thiols de faibles poids moléculaires tels que la cystéamine et le β -mercaptoethanol, améliore la synthèse de glutathion médiée par la cystéine. De plus, la supplémentation des milieux de maturation *in vitro* à l'aide de cystéamine s'est avérée efficace pour améliorer le développement embryonnaire *in vitro* chez le bovin [de Matos, 1996 #237][de Matos, 1995 #238], chez les ovins [de Matos, 2000 #234] et les porcins [Gruppen, 1995 #230][Bing, 2001 #436]). La cystéamine réduit la cystine en cystéine et favorise l'entrée dans la cellule de la cystéine, ce qui augmente la synthèse de GSH [de Matos, 1995 #238]. A notre connaissance, l'influence de la cystéamine sur les taux de MIV et de FIV n'a pas encore été étudiée dans l'espèce équine. Pourtant la cystéamine pourrait influencer de manière positive la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte équin.

En effet, les changements importants qui préparent l'ovocyte à la fécondation et au développement embryonnaire sont habituellement divisés en deux catégories. D'une part, les événements impliqués dans la progression de la méiose vers la métaphase II, appelés : maturation nucléaire et d'autre part, les événements qui ont lieu au sein du cytoplasme et qui favorisent la fécondation monospermique et le développement de l'embryon avant son implantation, appelés : maturation cytoplasmique [Goudet, 1998 #438][Szollosi, 1991 #437]. La maturation nucléaire peut être évaluée grâce à la microscopie à fluorescence. Chez les mammifères, la migration de granules corticaux (GC) est une étape importante de la maturation cytoplasmique [Cran, 1989 #442][Baka, 1995 #440]. Malgré l'existence de quelques articles concernant l'ultrastructure [Grondahl, 1995 #359][Tremoleda, 2001 #417] et les changements biochimiques [Goudet, 1998 #7][Goudet, 1998 #6] de l'ovocyte équin durant sa maturation, la seule étude portant sur l'évaluation de la maturation cytoplasmique de l'ovocyte équin est celle de Neumann et collaborateurs [Neumann, 1995 #443]; toutefois, elle porte sur un nombre total de 14 ovocytes. Goudet et collaborateurs [Goudet, 1997 #12] ont étudié la localisation des granules corticaux comme critère d'évaluation de la maturation cytoplasmique. A notre connaissance aucun autre article sur la maturation de l'ovocyte équin n'a été publié. L'évaluation de la maturation cytoplasmique est donc moins accessible que celle de la maturation nucléaire. Le meilleur critère de maturation cytoplasmique des ovocytes est leur capacité à être fécondés. Pour la plupart des mammifères domestiques, le critère de fécondation *in vitro* est utilisé.

La production d'embryons *in vitro* est le résultat d'un processus en trois étapes : la Maturation *In Vitro* (MIV), la Fécondation *In Vitro* (FIV) et la Culture *In Vitro* (CIV) de l'embryon jusqu'à un stade où il peut être transféré dans l'utérus d'une receveuse. Dans l'espèce équine, la FIV se révèle

être le maillon faible de ce processus, principalement suite à l'absence d'une technique efficace de capacitation *in vitro* des spermatozoïdes d'étalon [Dell'Aquila, 1996 #400]. Pour contourner les difficultés de FIV, d'autres méthodes de production d'embryons à partir d'ovocytes isolés ont été explorées. Le transfert d'ovocytes dans le follicule préovulatoire d'une jument receveuse inséminée (IntraFollicular Oocyte Transfer ou IFOT) a permis de produire des embryons mais les résultats ont été peu encourageants [Hinrichs, 1991 #286][Palmer, 1997 #23]. Les piètres résultats obtenus par cette technique ont conduit à envisager le transfert d'ovocytes maturés directement dans l'oviducte d'une jument receveuse ou Gamete IntraFallopian Transfer (GIFT). Les trois premières études ont rapporté des taux de production d'embryons par GIFT allant de 8% (2/26) [Ray, 1994 #445], 13% (2/15) [McKinnon, 1988 #444] à 17% (5/29) [Zhang, 1989 #446]. Cependant il convient de noter que ces études utilisaient des ovocytes maturés *in vivo* ponctionnés et ensuite immédiatement transférés dans l'oviducte d'une receveuse. En 1997, s'inspirant des résultats obtenus deux années plus tôt par Carnevale [Carnevale, 1995 #447], Hinrichs et collaborateurs [Hinrichs, 1997 #448] ont obtenu un taux de production d'embryon de 75% (6/8) après transfert d'un ovocyte unique récolté 24 heures après stimulation par hCG et mûré *in vitro* 16 à 20 heures avant transfert. Ces résultats font du GIFT une procédure viable et une alternative clinique au transfert d'embryon pour des juments de haut niveau présentant des troubles spécifiques [Hinrichs, 2002 #250]. Pour s'assurer de la qualité des ovocytes, c'est-à-dire de leur capacité à être fécondés, des fécondations *in vivo* peuvent être réalisées par transfert des ovocytes dans l'oviducte d'une jument receveuse inséminée. En l'absence d'une technique de FIV efficace et reproductible [Dell'Aquila, 1996 #400], la fécondation et le développement embryonnaires *in vivo* restent le meilleur moyen d'évaluer les procédures de MIV.

Objectif

L'objectif de ce protocole est double. D'une part, il vise à établir une technique capable d'évaluer la compétence des ovocytes à être fécondés après maturation *in vitro*.

D'autre part, il vise à évaluer l'effet de la cystéamine sur la maturation nucléaire et cytoplasmique *in vitro*. La maturation cytoplasmique est évaluée par l'aptitude des ovocytes à être fécondés *in vivo* et donc à produire des embryons. Pour cela, des fécondations *in vivo* seront réalisées par transferts d'ovocytes dans l'oviducte de juments receveuses inséminées. Cette technique, plus couramment appelée GIFT (gamete intrafallopian transfer), est déjà utilisée dans le laboratoire [Saint Dizier M., 2001 #402]. Les ovocytes seront collectés par ponction folliculaire transvaginale échoguidée sur des ponettes de type Welsh. Pour la maturation *in vitro*, ils seront ensuite placés dans deux milieux de culture : un milieu contenant de la cystéamine et un milieu contrôle, ce qui nous permettra d'analyser l'influence de la cystéamine pendant la maturation *in vitro* sur la maturation nucléaire et cytoplasmique.

Matériel et méthode

Fécondation in vivo par transfert des ovocytes dans l'oviducte

Animaux

Les donneuses et les receveuses sont des ponettes de type Welsh de 200 à 300 kg de poids vif, en bonne condition physique et en œstrus. La croissance des follicules ovariens est suivie quotidiennement à l'aide d'un échographe Aloka 210 muni d'une sonde linéaire 5 MHz. Ceci permet de détecter l'apparition d'un follicule préovulatoire

Induction de l'ovulation

Pour les donneuses et les receveuses, l'ovulation est induite par injection intra-veineuse de 25 mg d'extraits hypophysaires équins (Crude Equine Gonadotrophine, CEG) lorsque le follicule dominant atteint un diamètre de 33 mm. L'objectif est une augmentation des taux plasmatiques de LH. L'ovulation a lieu en moyenne 36 heures après l'injection [Duchamp, 1987 #396].

La collecte d'ovocytes par ponction transvaginale échoguidée

Grâce à la grande taille du follicule chez la jument, la ponction de l'ovocyte par voie transvaginale sous contrôle échographique est assez simple [Duchamp, 1995 #449][Goudet, 1997 #12]. Au cours de ces ponctions, il est possible de collecter des ovocytes matures dans le follicule préovulatoire et des ovocytes immatures dans les petits follicules, ce sont eux qui seront transférés dans la ponette receveuse. On détermine la taille des follicules grâce à l'échographe.

La technique de ponction nécessite l'utilisation d'une sonde sectorielle à balayage électronique de 7,5MHz et d'un échographe Aloka SSD.900 (Société Bernard, France).

Pour des questions de commodité, la collecte se déroule 24h après l'induction de l'ovulation par une injection de 25mg de CEG (Crude Equine Gonadotropin)[Duchamp, 1995 #449]. La ponette est placée dans une barre de contention et reçoit une première injection intraveineuse de détomidine (Domosedan®, 0.1ml/animal, Pfizer, France). Le rectum est vidé et la région périnéale est lavée avec de la povidone iodine (Vétédine® savon, solution à 10%, Race Horse Veterinary product, USA). La ponette reçoit juste avant la ponction une deuxième injection en intraveineuse de détomidine (0,15ml/animal) et de propanthéline bromide (60mg/animal, ref P-8891 Sigma, France). La propanthéline relaxe les muscles lisses et en particulier ceux du rectum ce qui facilite le maintien de l'ovaire par le manipulateur. De plus, la ponette reçoit en intramusculaire de la dexaméthasone (Dexadreson®, 6ml/animal, Intervet, France).

Un premier opérateur saisit l'ovaire à travers la paroi rectale et le positionne devant la sonde échographique qu'il maintient dans le vagin (Figure 1 A-B). Un deuxième opérateur introduit l'aiguille le long de la sonde et avance jusqu'à la voir apparaître sur l'écran de l'échographe, au centre du follicule. Le liquide folliculaire est aspiré, une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco A, code BR14, Oxoid, France) hépariné (héparine sodique 5UI/ml, Sanofi, France) à 37°C est injectée puis aspirée pour rincer le follicule. Pendant l'aspiration, le second opérateur effectue une rotation complète de l'aiguille pour gratter la paroi folliculaire afin d'en détacher l'ovocyte. Comme décrit par Duchamp et collaborateurs [Duchamp, 1995 #449], les follicules de plus de 25mm sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille à simple voie (longueur 600mm, diamètre extérieur 1,8mm ; Thiebaud Frères, Jouvernex Margencel, France) et ponctionnés et remplis à 5 reprises. Les follicules de moins de 25mm sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille à double voie (longueur 700mm, diamètre extérieur 2,3mm, diamètre intérieur 1,35mm ; CASMED, Cheam Surrey, England). Les 10 rinçages de ces follicules se font de manière continue, l'aspiration est interrompue temporairement pour permettre un bon remplissage de la cavité antrale avant de poursuivre la récolte du liquide de rinçage.

Pour prévenir une éventuelle infection à la suite de la ponction, une injection de 20ml d'Intramycine[®], 400000 UI/animal de dihydrostreptomycine, 4g/animal de benzylpenicilline procaine, Ceva, France) est réalisée par voie intramusculaire.

Le liquide folliculaire et les liquides de rinçage sont récoltés dans des tubes stériles de 50ml (type Falcon) puis immédiatement transmis en salle de culture pour rechercher l'ovocyte. Les liquides sont versés dans des boîtes de pétri stériles à 37°C. La recherche des ovocytes se fait sous loupe binoculaire (grossissement de 8 à 50 fois). Les taux de collecte des ovocytes préovulatoires et immatures sont comparés aux valeurs mentionnées dans la littérature en appliquant un test non-paramétrique (test de Z) à l'aide du logiciel SAS.

La maturation *in vitro* des ovocytes

Avant la mise en culture, chaque complexe ovocyte-cumulus (COC) est observé et classifié comme décrit par Goudet et collaborateurs [Goudet, 1998 #6]. On distingue trois catégories de cumulus (Figure 2 A-D):

- Cumulus compact : les contours du cumulus sont réguliers et les cellules sont compactes autour de l'ovocyte.
- Cumulus en début d'expansion : les contours du cumulus sont irréguliers, quelques cellules sont détachées de la surface du cumulus et il y a un léger détachement des cellules entre elles.
- Cumulus expansé : toutes les cellules sont détachées de l'ovocyte et entre elles, il y a présence de matrice entre les cellules du cumulus.

Les ovocytes sont rincés dans 500µl de PBS (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco A, code BR14, Oxoid, France). La maturation des ovocytes se fait individuellement : chaque ovocyte est placé

dans une goutte de 20 µl de milieu de maturation sous 3ml d'huile minérale (ref M8410, Sigma, France). Deux milieux de maturation *in vitro* sont comparés :

- Un milieu contrôle à base de TCM 199 (ref M4530, Sigma, France), 50 ng/ml d'EGF (Epidermal Growth Factor, ref E4127, Sigma, France) et 20 % de Sérum de Veau Fœtal (ref F4135, Sigma, France)
- Un milieu cystéamine qui correspond au milieu contrôle supplémenté de 100µM de cystéamine (ref M9768, Sigma, France).

La maturation dure 30 heures à l'obscurité, à 38,5°C, sous 5% de CO₂ et sous atmosphère saturée en humidité.

Analyse des ovocytes après maturation *in vitro* ou préparation pour le transfert.

En fonction des résultats des séances d'OPU, les ovocytes sont soit analysés, soit préparés en vue d'un transfert dans une jument receveuse.

Si le nombre d'ovocytes récoltés est supérieur à 10, 10 ovocytes sont préparés pour un transfert, les ovocytes excédentaires sont analysés. Si le nombre d'ovocytes récoltés est inférieur à 10, tous sont analysés. Les ovocytes destinés à être transférés sont rincés 3 fois dans 3 puits contenant 500µl de PBS puis conservés quelques minutes en attendant le transfert dans un 4^e puit de PBS à 38,5°C. Le transfert est réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile érodée connectée à un tuyau lui-même connecté à une seringue de 1ml. Les ovocytes sont aspirés dans la pipette Pasteur dans 2µl de PBS, entre deux bulles d'air. L'analyse des ovocytes permet d'estimer le taux de maturation *in vitro* pour les ovocytes transférés. Après MIV, l'ovocyte est rincé dans une 1^{ère} goutte de PBS et l'état de son cumulus est observé. Les cellules du cumulus sont ensuite enlevées dans une 2^{ème} goutte de PBS par aspirations répétées à l'aide d'une pipette fine. L'ovocyte dénudé est alors rincé dans une 3^{ème} goutte de PBS et coloré à l'aide de 1µg/ml de bis-benzamide (Hoechst 33342 à 1mg/ml H₂O, Sigma, France). Le Hoechst permet l'observation de la chromatine de l'ovocyte par fluorescence sous rayonnement ultraviolet. Enfin, l'ovocyte est déposé sur lamelle en micro-gouttes et observé au microscope inversé. L'état de l'ooplasm est caractérisé comme décrit par Goudet et collaborateurs [Goudet, 2000 #404], de même que la configuration de la chromatine, qui est utilisée pour classer les ovocytes en différents stades : « vésicule germinale », « chromatine dense », « métaphase I », « métaphase II », « dégénéré », comme décrit par Goudet et collaborateurs [Goudet, 1998 #6]. (Figure 3 A-D)

Les taux de maturation en métaphase II sont comparés à ceux rapportés dans la littérature en utilisant un test non-paramétrique (test de Z) à l'aide du logiciel SAS. Un test de Chi carré est utilisé pour comparer les taux de métaphase II après maturation dans le milieu contrôle à ceux du milieu cystéamine.

Préparation de la receveuse et transfert des ovocytes

Le jour de la récolte des ovocytes, une jument receveuse qui présente un follicule mesurant au moins 33mm reçoit une injection de 25mg de CEG et est mise à la diète pendant 24 heures. Le transfert des ovocytes dans l'oviducte de la receveuse, s'effectue 30 heures après l'induction de l'ovulation, du côté contra-latéral du follicule préovulatoire afin de ne pas perturber l'ovulation naturelle de la jument.

Juste avant le transfert, le flanc de la receveuse est tondu et elle reçoit une injection intramusculaire d'antibiotique (30ml Intramycine[®], Ceva, France). Elle est ensuite placée dans une barre de contention sous sédation à l'aide de détomidine (0,2ml/animal, Domosedan[®], Pfizer, France) et de butorphanol (0,4ml/animal, Torbugesic[®], Fort Dodge, Southampton, UK). Lors du transfert, la ponette reçoit une perfusion intraveineuse de solution sédative (Domosedan[®], Pfizer, France). Une sonde urinaire à ballonnet est posée pour permettre une vidange continue de la vessie et limiter l'inconfort de la jument pendant la chirurgie. Après aseptie et anesthésie locale, une laparotomie latérale est réalisée pour accéder à l'ovaire. L'incision cutanée de 10 à 15 cm est orientée verticalement ou légèrement en oblique vers le pli du grasset. Les muscles du flanc, dans l'ordre : l'oblique externe, l'oblique interne et le muscle transverse de l'abdomen sont disséqués en respectant l'orientation propre de leurs fibres. Le péritoine est ponctionné et l'ouverture est agrandie manuellement. L'ovaire est alors extériorisé et l'extrémité érodée de la pipette Pasteur est délicatement introduite dans le pavillon de l'oviducte puis poussée dans l'oviducte (2 à 5 cm). Les ovocytes contenus dans la pipette sont ensuite injectés. La pipette est sortie de l'oviducte, puis rincée avec du PBS pour s'assurer que tous les ovocytes ont bien été déposés. Après le transfert, la plaie de laparotomie est suturée classiquement.

Insémination artificielle de la jument receveuse

Pour le protocole, un seul étalon de fertilité connue et normale a été sélectionné. 5 heures avant le transfert, la ponette receveuse est inséminée, en sperme frais avec 400×10^6 spermatozoïdes totaux dans 10ml INRA96[®] (brevet INRA, IMV Technologies, France). Elle est inséminée une deuxième fois en sperme conservé à 15°C avec 200×10^6 spermatozoïdes totaux dans 10ml INRA96[®] juste après le transfert.

Collecte des embryons et contrôle de filiation :

La collecte des embryons a lieu 10 jours après l'ovulation de la ponette receveuse par 3 lavages utérins avec 500ml de sérum physiologique à 38°C. Le liquide ainsi collecté est filtré puis les embryons sont recherchés sous loupe binoculaire. Ils sont ensuite rincés dans 10 bains de sérum physiologique et conservé à sec dans un tube eppendorf à -20°C pour déterminer leur origine maternelle (ovocyte de la jument receveuse ou d'une des donneuses).

Un contrôle de filiation est réalisé par typage d'ADN [Guerand, 1997 #20]. Des prises de sang sont effectuées sur la receveuse et l'étalon pour permettre ce contrôle de filiation. Les taux d'embryons produits après maturation des ovocytes dans le milieu contrôle et le milieu cystéamine sont comparés en appliquant les méthodes exactes (test F de Fischer).

Résultats

Collecte des ovocytes

Les séances de ponction ont permis la récolte d'un total de 134 ovocytes. Les taux de collecte globaux (i.e. nombre d'ovocytes collectés/nombre de follicules ponctionnés) sont présentés dans le tableau 1.

- 61% pour les follicules préovulatoires.
- 49% pour les follicules immatures.

Notre taux de collecte de 61% pour la ponction de follicules préovulatoires est significativement différent de celui rapporté dans la littérature ($p < 0,01$).

Notre taux de collecte de 49% pour la ponction de follicules immatures est statistiquement équivalent à ce qui est rapporté dans la littérature [Goudet, 1997 #12].

Analyse des ovocytes préovulatoires

Sur les 14 ovocytes issus de follicules préovulatoires, 13 seulement ont été colorés au Hoechst et analysés. Les stades nucléaires immédiatement observés sont repris dans le tableau 2.

Maturation *in vitro* des ovocytes

Sur les 120 ovocytes immatures collectés, 3 ovocytes n'ont pas été mis en culture. La répartition des 117 ovocytes mis en culture par milieu est donnée dans le tableau 3, de même que la proportion d'ovocytes transférés et soumis à l'analyse sous microscope inversé après coloration au Hoechst.

Le tableau 4 illustre la répartition des ovocytes dans les différents stades de maturation nucléaire identifiés, exprimée en pourcentage à partir du nombre total d'ovocytes mis en culture. Les taux de maturation de 43% que nous avons obtenus ne sont pas significativement différents de ceux rapportés dans la littérature avec un milieu de maturation identique à notre milieu contrôle [Goudet, 1997 #12]. Les taux de métaphase II de 36% pour les ovocytes mis à maturer dans le milieu contrôle ne sont pas significativement différents des taux de 47% de métaphase II que nous avons obtenus pour les ovocytes maturés dans le milieu cystéamine.

collecte des embryons et Résultat des filiations

Le tableau 5, illustre les résultats des récoltes d'embryons réalisées 10 jours après le transfert. Ce tableau présente les nombres d'embryons récoltés par jument, les nombres d'embryons compatibles versus incompatibles avec la jument receveuse après test de filiation par typage d'ADN,

et donc le nombre d'embryons issus du transfert d'ovocytes après maturation dans le milieu contrôle ou le milieu cystéamine.

Les taux d'embryons produits à partir d'ovocytes issus d'une maturation dans le milieu contrôle ne sont pas significativement différents de ceux pour les ovocytes maturés dans le milieu cystéamine.

Discussion

Taux de collecte des ponctions

La collecte d'ovocytes équins par ponction échoguidée ou Ovum Pick Up (OPU) est une technique qui depuis sa première description en 1992 [Bruck, 1992 #399] a été utilisée et améliorée dans différents laboratoires [Bruck, 1997 #397][Duchamp, 1995 #449]. Les rendements de prélèvements d'ovocytes par ponction transvaginale échoguidée ont évolué et sont actuellement de:

- ◆ 80 % pour les follicules préovulatoires ([Bezard, 1995 #450][Goudet, 1997 #12]
- ◆ 50% pour les follicules immatures [Goudet, 1997 #12].

Notre taux de collecte de 61% pour la ponction de follicules préovulatoires est significativement différent de celui rapporté dans la littérature. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs raisons. D'une part, le protocole de ponction échoguidée inclut l'utilisation de CEG [Duchamp, 1987 #396] induisant la maturation des follicules et le déclenchement des mécanismes de l'ovulation. Nous avons réalisé les ponctions 24h post CEG et non pas 35h comme dans les protocoles de ponction classiques. La maturation folliculaire et donc le processus menant à l'ovulation étant moins avancés, l'ovocyte est plus solidaire de la paroi du follicule. En effet, par rapport à l'ovocyte bovin, l'ovocyte équin est attaché de manière beaucoup plus ferme à la paroi du follicule. Son cumulus oophorus comporte moins de fenestrations et il présente une morphologie plus trapue dépourvue d'un « col » comme point de rupture [Hawley, 1995 #452]. De plus, Les cellules du cumulus équin possèdent des processus qui atteignent la thèque et qui ancrent le COC à la paroi du follicule [Hinrichs, 1998 #265]. D'autre part, notre protocole nécessitait la mise en maturation d'ovocytes immatures. Les ovocytes obtenus à partir de follicules préovulatoires représentant peu d'intérêt pour notre manipulation, nous nous sommes donc limités à 5 rinçages de la cavité antrale de ces follicules lors des ponctions, au lieu des 10 habituellement réalisés pour améliorer le taux de récupération des ovocytes issus de follicules préovulatoires.

La technique utilisée a été établie par Duchamp et collaborateurs [Duchamp, 1995 #449], et nous avons pu bénéficier de leur expérience pour nos propres collectes. Les taux de collecte pour les follicules immatures sont généralement inférieurs à ceux des follicules préovulatoires. En effet, les connections entre l'ovocyte et les cellules du cumulus et de la paroi folliculaire sont beaucoup plus lâches que dans les follicules préovulatoires qui sont prêts à libérer l'ovocyte.

Taux de maturation des ovocytes

Les taux de maturation *in vitro* des ovocytes équins varient entre les laboratoires mais restent, quoi qu'il en soit, plus bas que dans les autres espèces domestiques. On considère généralement que les taux de maturation dans l'espèce équine varient de 40 à 70% [Bogh, 2002 #13][Goudet, 1997

#12][Squires, 1996 #156]. Les taux de maturation de 43% que nous avons obtenus sont donc comparables à ceux rapportés dans la littérature avec un milieu de maturation identique à notre milieu contrôle [Goudet, 1997 #12]. Cependant, des taux plus élevés sont généralement observés lorsque les ovocytes sont mis à maturer en groupes [Dell'Aquila, 1996 #400][Shabpareh, 1993 #454]. Idéalement, des groupes homogènes de 10 à 20 ovocytes sont mis en culture ; ce qui convient davantage lorsque l'on dispose d'effectifs d'ovocytes importants, par exemple récoltés à partir d'ovocytes d'abattoir. La ponction échoguidée des ovocytes ne permet d'obtenir que des effectifs faibles et variables d'un jour à l'autre. Dans notre cas, les groupes auraient varié de 1 à 10 ovocytes en fonction des jours ce qui aurait introduit une hétérogénéité dans les conditions de culture. Une maturation individuelle garantit des conditions de mise en culture identiques quel que soit le nombre d'ovocytes collecté. Nous avons opté pour une maturation des ovocytes de manière individuelle en goutte sous huile, ce qui explique sans doute en partie les taux de maturation obtenus.

Collecte des embryons et Résultat des filiations

Dans notre étude, les taux de production d'embryons pour les ovocytes maturés dans le milieu contrôle sont de 22% (6/27). Les taux de production d'embryons rapportés dans la littérature vont de 8% (2/26) [Ray, 1994 #445] à 13% (2/15) [McKinnon, 1988 #444] pour les études utilisant des ovocytes maturés *in vivo* et de 75% Hinrichs et collaborateurs [Hinrichs, 1997 #448] à 83% [Carnevale, 1995 #447] pour des ovocytes maturés *in vitro* pendant 16 heures. Cependant, ces études ont été réalisées sur des ovocytes récoltés après stimulation de follicules dominants par une gonadotrope. Les raisons pour lesquelles les taux restent plus bas pour des ovocytes récoltés immédiatement avant l'ovulation et transférés dans l'heure par rapport à des ovocytes récoltés 24 heures après stimulation par hCG ne sont pas claires. Il est probable que la technique et l'expérience du manipulateur soient déterminantes. Il est également possible que des ovocytes en métaphase I (24 heures post-hCG) supportent mieux les agressions que constitue la procédure de transfert [Hinrichs, 1998 #273] que les ovocytes en métaphase II. L'adjonction de cystéamine aux milieux de maturation s'est avérée efficace pour améliorer les taux de FIV et de développement embryonnaire dans différentes espèces telles que les bovins [de Matos, 1996 #237][de Matos, 1995 #238], les ovins [de Matos, 1999 #453] et les porcins [Gruppen, 1995 #230][Bing, 2001 #436]. Nos travaux montrent que, dans l'espèce équine, la cystéamine n'améliore pas le pourcentage d'embryons produits 10 jours après transfert.

Différents paramètres limitent nos travaux. La technique de récolte malgré ses avantages ne permet d'obtenir qu'un nombre limité et variable d'ovocytes disponibles pour l'analyse ou le transfert. Chaque jument receveuse reçoit des ovocytes issus d'un seul lot de maturation, ce qui empêche toute comparaison pour une même receveuse. Afin de garantir la présence d'un matériel génétique suffisant pour réaliser le test de filiation, la récolte des embryons est réalisée 10 jours après le transfert, alors que les embryons équins peuvent être collectés dans l'utérus dès 6 jours et demi. Ce délai

supplémentaire peut également affecter le taux de récolte suite aux phénomènes de mortalité embryonnaire précoce qui ne sont pas quantifiables. On ne peut pas comparer des taux de fécondation ou de développement embryonnaire précoce.

Pour contourner ces limites, certaines améliorations sont envisageables. Par exemple : tester ce même effet de la cystéamine sur un plus grand nombre d'ovocytes mis à maturer et transférés, transférer simultanément dans une même receveuse des ovocytes issus des deux lots en les marquant (e.g. à l'aide d'un radio-isotope faiblement radioactif ou d'un colorant) ou en testant leur filiation pour identifier la donneuse. Le marquage ou le test génétique permettant d'identifier a posteriori l'origine des embryons produits, on pourrait alors comparer les taux d'embryons issus d'une même chirurgie et d'une même porteuse (observations paires) ; ce qui permettrait d'augmenter la puissance du test sans augmenter la taille de l'échantillon. On pourrait aussi transférer un lot d'ovocytes dans un oviducte et l'autre lot dans l'oviducte contra-latéral et réaliser un flush salpyngien 1 ou 2 jours après transfert pour limiter les mortalités embryonnaires précoces.

Conclusion

Les techniques de reproduction assistée chez la jument ont fait de grands pas en avant durant ces dernières décennies. Néanmoins, l'étape de la FIV reste un facteur limitant. En l'absence d'une technique efficace et fiable de FIV, l'étude de la fécondation *in vitro* dans son ensemble, ses applications pratiques et l'étude du mécanisme de fécondation et du développement précoce de l'embryon difficilement réalisable *in vivo*, sont fortement freinées.

Notre protocole n'a pas pu démontrer d'effet de la cystéamine sur les taux de production d'embryons 10 jours après transfert de gamètes ; cependant il a mis en lumière des améliorations possibles pour poursuivre notre étude. Il a également permis de mettre en place un outil qui rend possible l'évaluation la maturation cytoplasmique des ovocytes après MIV. Dans l'attente de la mise au point de techniques de FIV efficaces, il s'agit du seul outil disponible pour tester cette étape de la maturation de l'ovocyte.

Nous avons également pu démontrer que les ovocytes mis à maturer *in vivo* dans nos conditions expérimentales sont capables d'être fécondés. Nous pouvons donc continuer à travailler sur les techniques de FIV en sachant qu'au terme de l'étape de la MIV nos ovocytes sont de bonne qualité.

Enfin, nous avons développé une technique de reproduction assistée qui peut être d'application directe pour des juments infertiles qui sont incapables de produire un embryon. Par exemple pour des juments présentant des troubles liés au follicule préovulatoire ou de l'ovulation (e.g. troubles de la maturation préovulatoire, ovulation retardée, lutéinisation sans ovulation, ...) ou des troubles des voies génitales (e.g. salpyngite chronique, ...).

Références bibliographiques

Tableau 1

	Nombre de follicules ponctionnés	Nombre d'ovocytes collectés	Taux de collecte
Préovulatoire	23	14	61%
Immature	245	120	49%
total	268	134	50%

Tableau 2

Stade nucléaire				
Métaphase II	télophase	Métaphase I	Chromatine dense	dégénéré
7%	7%	43%	7%	29%

Tableau 3

	Nombre ovocytes mis en culture	Nombre d'ovocytes transférés	Nombre d'ovocytes analysés
Lot contrôle	52	27	25
Lot cystéamine	65	27	38
total	117	54	63

Tableau 4

Milieu de maturation	Stade nucléaire				
	Métaphase II	Métaphase I	Chromatine dense	Vésicule Germinale	Dégénéré
CONTROLE	9/25	2/25	2/25	2/25	10/25
CYSTEAMINE	18/38	4/38	3/38	1/38	12/38
Total	27/63	6/63	5/63	3/63	22/63

Tableau 5

	Stade nucléaire				
Milieu de maturation	Métaphase II	Métaphase I	Chromatine dense	Vésicule Germinale	Dégénéré
CONTROLE	36%	8%	8%	8%	40%
CYSTEAMINE	47%	11%	8%	3%	32%
Total	43%	10%	8%	5%	35%

Tableau 6

receveuse	milieu maturation	ovocytes transférés	embryons	filiation Compatible/ Incompatible.	Embryon issu du GIFT
W417	CONTROLE	10	2	1C/1I	1
W520	CONTROLE	10	5	0C/5I	5
W544	CONTROLE	10	1	1C	0
W344	CYSTEAMINE	10	2	1C/1I	1
W454	CYSTEAMINE	10	2	1C/1I	1
W519	CYSTEAMINE	10	0	-	0

